

Análisis del crecimiento de hongos con interés nutracéutico sobre diversos sustratos vegetales: optimizando dos protocolos de cultivo miceliar

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Tutora:
Marisa Castro Cerceda

Departamento de Biología Vegetal
y Ciencias del Suelo

Vázquez Fernández, E.

evavf25@gmail.com

Resumen

Con este trabajo se pretende realizar un análisis comparado del crecimiento de dos hongos macromicetos, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*, en dos sustratos vegetales uno de procedencia comercial, pellet de paja, y otro de procedencia natural, constituido básicamente por eucaliptos y palmeras. Se sembraron los micelios de ambas especies en cada uno de los sustratos, se incubaron en estufa y se midió diariamente su crecimiento, posteriormente se realizaron los análisis estadísticos pertinentes con el fin de saber cuál de los sustratos es más rentable para el cultivo de cada una de las especies. Durante la realización de los cultivos se detectaron problemas de crecimiento, por lo cual se proponen modificaciones para optimizar los protocolos.

Introducción

En la actualidad se considera que los eumicetos son organismos eucariotas, sin flagelos, que se reproducen sexualmente por esporas gaméticas, presentan quitina en sus paredes celulares, carecen de clorofila (heterótrofos), presentan digestión externa (lisis y absorción) y la sustancia de reserva que almacenan es glucógeno. Son químicamente mucho más parecidos a los animales que a las plantas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Al ser heterótrofos necesitan obtener la materia orgánica elaborada a partir de otros organismos, ya sea mediante restos orgánicos muertos (saprotróficos) o de organismos vivos por relaciones mutualistas o parásitas (biotróficos). Además, para poder cultivar o «domesticar» hongos silvestres es necesario tener en cuenta que el hongo está formado por dos partes bien diferenciadas: la vegetativa o micelio y el cuerpo fructífero (basidioma o ascoma) portador de las esporas gaméticas. En general el micelio se encuentra subterráneo, protegido del exceso de luz y la desecación causada por el ambiente (Castro *et al.*, 2005).

Por ello, los hongos que muestran mayor interés para ser cultivados son los que presentan unas características fisiológicas y ecológicas mejor conocidas, así que a excepción de las trufas (*Tuber* sp) que se incluyen en el phylum Ascomycota, pertenecen a Basidiomycota, como la cola de pavo (*Trametes versicolor* (L.) Lloyd) y la seta ostra (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.Kumm.) que, con cierta facilidad, producen fructificaciones.

El cultivo de hongos saprotróficos se practica desde hace más de 4.000 años sobre troncos de madera en China y, probablemente, comenzó con la oreja de Judas (*Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél.), (Sierra *et al.*, 2002) y, en la

Roma antigua era habitual recolectar la seta de chopo (*Cyclocybe aegerita* (V.Vrig) Vizzini) para frotarla sobre cepas cortadas o troncos de estos árboles (*Populus* sp) y así obtener alimento fácil durante el verano y el otoño (Sierra *et al.*, 2002). Sin embargo, el cultivo se normaliza en Francia, a partir del año 1650, cuando se realizaron los primeros intentos para cultivar el champiñón de París (*Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach).

El consumo de hongos silvestres por parte del ser humano se remite a la prehistoria, incluida la Península Ibérica (Strauss *et al.*, 2015), y continúa existiendo hasta la actualidad; pero, con el aumento poblacional de las últimas décadas, el consumo ha aumentado considerablemente al verificar que, además de mostrarse como excelentes elementos culinarios, poseen propiedades nutracéuticas, son alimentos en los que se han descrito numerosas propiedades beneficiosas para la salud, entre las que destaca el alto contenido en minerales y vitaminas, el significativo aporte de numerosos aminoácidos esenciales y las importantes propiedades carcinostáticas, hipocolesterolemiantes, inmunoreguladoras e hipotensoras que se han detectado en ellos (Suárez & Holguín., 2011).

Otro aspecto interesante, relacionado con la fungicultura, es su uso para la biorremediación de suelos contaminados (Castillo, 2005; Coello, 2011) o la degradación de residuos forestales mediante el cultivo de macromicetos con capacidades nutracéuticas. Por ello, en los últimos años, los países productores de madera han intentado buscar una alternativa para la gestión de los residuos producto de la actividad forestal (Varnero *et al.*, 2010; Ozcariz Fermoselle, 2016). Es en este ámbito en el que se encuadra este trabajo, se experimenta con un sustrato procedente de podas y limpiezas de jardines y plantaciones forestales, suministrado por la Comunidad de

Montes de Coruxo (Vigo) y se compara con otro comercial procedente de paja de cereal.

En nuestras latitudes, entre las especies cultivadas como comestibles, destacan las ya mencionada seta de ostra y champiñón de París, pero en los últimos años se ha extendido también el de shii-take o seta china (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) y, más recientemente, otras como las setas de ostra rosada (*Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn) o amarilla (*Pleurotus citrinopileatus* Sing.).

También cultivables existen otras especies no comestibles, pero que ofrecen especial interés como micoterapéuticas, es el caso de la citada cola de pavo, el reishi o pipas de monte (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.), la melena de león (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.) o el maitake (*Grifola frondosa* (Dicks.) Gray), entre otras (Lindequist *et al.* 2014). A excepción del shii-take y de las setas de ostra rosada y amarilla todas estas especies forman parte de la micobiota gallega (Rodríguez-Vázquez & Castro, 2016). Por ello, para este trabajo se han seleccionado una especie comestible *Pleurotus ostreatus*, y otra de aplicación micoterapéutica, *Trametes versicolor*.

Objetivo y Plan de trabajo

El objetivo de este trabajo es valorar el rendimiento comparado de dos sustratos, pellet comercial de paja prensada y sustrato vegetal de origen arbóreo, especialmente de eucaliptos y palmeras, en el crecimiento miceliar de dos especies de hongos macromicetos lignolíticos como la seta de ostra (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. y la cola de pavo (*Trametes versicolor* (L.) Lloyd) mediante el uso de micelios comerciales.

Materiales y metodología de trabajo

Como en todo trabajo científico se ha realizado una exhaustiva búsqueda bibliográfica, con el fin de conocer tanto el tipo de sustrato, como su posible utilización, con el fin de diseñar el experimento. Se comienza con la siembra y resiembra en placas PDA (agar-patata-dextrosa) de los micelios comerciales y la preparación de los sustratos en los que se va a sembrar los micelios de ambas especies.

Partiendo de micelio comercial de ambas especies se procede a la replicación en placas PDA (agar-patata-dextrosa) comerciales con pH 5,6. Se siembran 6 placas para cada especie en ambiente estéril, en el interior de una cabina de flujo laminar (Cruamir, 9005-FL). Para ello se coloca un pellet en el centro de cada una de las placas, que se incuban en estufa (Raypa, incubador) a 25°C y oscuridad total hasta crecimiento máximo (García Rollán, 2007).

Cuando el micelio alcanza dicho máximo, en las mismas condiciones de asepsia, se corta un cuadrado de 1x1 cm de micelio, sin separarlo del agar, y se dispone en el centro de una nueva placa de PDA comercial. Se incuban en estufa a 25°C, en oscuridad, hasta que el micelio alcance 1 cm del borde (aconsejado para evitar contaminaciones posteriores). Las

placas deben ser revisadas diariamente. El proceso se repite en 20 placas por especie.

Simultáneamente, se preparan los sustratos. Los pellets de paja, que al ser un producto comercial seco es necesario hidratarlo previamente hasta conseguir un 70% de humedad (García Rollán, 2007). A continuación, se esterilizan en dos fases: la primera durante 15 min a 111°C y la segunda, 24 h más tarde, en la que se repite el proceso (Cañedo & Ames, 2004). Se han esterilizado 7 bolsas.

El sustrato vegetal mixto, básicamente formado por restos de eucaliptos (*Eucalyptus globulus* Labill.) y de palmeras (*Phoenix canariensis* hort. ex Chabaud) a los que se le mezclan todo tipo de restos leñosos procedentes de podas y desbrozado del monte, previamente troceados por una trituradora industrial. Por ello, antes de utilizarlo para el cultivo de micelio es necesario eliminar agentes extraños incluidos en el, como piedras, plásticos, etc que pueden servir de refugio a fases de resistencia de bacterias y hongos.

En este caso, la preparación se lleva a cabo en varias fases (Ríos *et al.*, 2010):

- congelado del sustrato durante 48 h a -18°C,
- secado en la estufa a 40°C durante 48 h,
- tamizado (2 mm Ø) para eliminar la fracción de suelo,
- triple lavado con agua destilada (proporción 1:1) pasándolo por un tamiz más fino (1 mm Ø) después de cada lavado, para eliminar el suelo restante,
- secado de nuevo del sustrato en la estufa a 40°C durante 48h
- conservación en el congelador a -18°C hasta su uso.

Antes de realizar la siembra, el sustrato ha de ser descongelado y esterilizado en autoclave. Este proceso se repite a las 24h. Se preparan 7 bolsas.

Las bolsas de sustrato, ya esterilizadas, se reparten en placas Petri, cuidando las condiciones de asepsia en el interior de la cabina de flujo laminar y se coloca un cuadrado de micelio de 1 x 1 cm en el centro de la placa de sustrato. Se realiza la siembra en 30 placas por especie y por sustrato, se cierran con parafilm y se incuban en la estufa a 25°C, en oscuridad.

Durante el proceso de crecimiento, el micelio se mide diariamente (radios mayor y menor) con regla graduada y homologada. Se hace lo mismo con la superficie de cobertura, mediante el uso de una gradilla milimetrada, de 5 x 5 mm.

Durante este período de medición se detectó que el material esterilizado a 111°C durante 15 minutos (Ríos *et al.*, 2010) estaba contaminado en un alto porcentaje, por lo que se ha repetido la experiencia y modificando los protocolos de actuación para evitar dichas contaminaciones.

Para ello, se ha procedido a humedecer el sustrato 24 h antes de la primera introducción en autoclave, se ha aumentado el tiempo de esterilización de 15 a 30 min, y la temperatura de 111 a 121°C, además de utilizar placas Petri nuevas, no reutilizadas y esterilizadas en el laboratorio con etanol y lejía como se hizo en el experimento anterior (Ríos *et al.*, 2010).

Por otra parte, en la columna de placas dispuestas dentro de la estufa, se ha decidido rotar la posición de las mismas cada 24 h, con el fin de que todas presenten un porcentaje de humedad semejante durante el proceso de crecimiento, ya que cuando aparece mucha condensación en la tapa, se provoca un exceso

de humedad, que no parece apta para el buen crecimiento miceliar, además de dificultar las mediciones.

Una vez finalizada la parte experimental deben anotarse los datos en una hoja de cálculo, utilizando el programa Excel (Microsoft Office 2013), para posteriormente poder realizar el análisis estadístico mediante el uso del programa R (R Core Team, 2017), calculando en primer lugar la tasa de crecimiento medio y el crecimiento acumulado a lo largo de los días.

A la vista de los resultados, se podrán realizar otros análisis gráficos como QQ plot, diagrama de cajas y densidad, así como un Shapiro Test para verificar la normalidad de los datos (Royston, 1982), junto con el test estadístico Krustal-Wallis y un análisis post-hoc empleando el método de corrección de Bonferroni (Dunn, 1964).

Resultados

Durante los 14 días que duró el segundo experimento se midieron los radios de crecimiento mayor y menor, de forma individualizada. Los resultados de la hoja de cálculo (Microsoft Excel) se resumen en la tabla 1.

SUSTRATO	ESPECIE	PLACAS SEMBRADAS	PLACAS CONTAMINADAS	CRECIMIENTO 100%	CRECIMIENTO MEDIO	CRECIMIENTO 0%	CRECIMIENTO (±1-100%)
VEGETAL MIXTO	<i>Pleurotus</i>	30	2	19	0	9	21
	<i>Trametes</i>	30	5	2	8	15	15
PELLETS	<i>Pleurotus</i>	30	14	15	1	0	30
	<i>Trametes</i>	30	18	11	1	0	21

Tabla 1: resumen de los datos obtenidos

A la vista de los resultados se ha decidido considerar para el análisis únicamente el valor de los radios mayores, ya que son los más representativos del crecimiento total para ambas especies y sustratos. El crecimiento acumulado durante los 14 días se representa en la figura 1, en la que se observa un crecimiento diario acumulado para las dos especies motivo de estudio: seta ostra (*Pleurotus ostreatus*) y cola de pavo (*Trametes versicolor*) y para ambos sustratos: pellet de paja y sustrato vegetal.

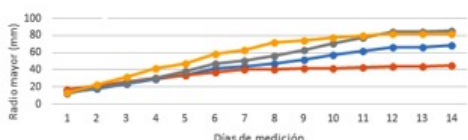


Figura 1: crecimiento miceliar en placas para cada uno de los sustratos y especies. Azul: sustrato *Pleurotus*, rojo sustrato *Trametes*, naranja Pellets *Trametes* y gris pellet *Pleurotus*.

Para analizar la velocidad de crecimiento diaria se ha calculado la tasa de crecimiento media entre cada uno de los días. Se representa en la figura 2, tanto para las dos especies como para los dos sustratos, es decir para los 4 tratamientos realizados: vegetal mixto con *Pleurotus*, vegetal mixto con *Trametes*, pellet con *Pleurotus* y pellet con *Trametes*.

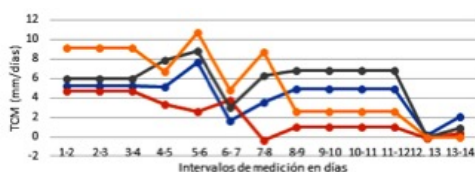


Figura 2: tasa de crecimiento media para cada uno de los días en las dos especies y los dos tipos de sustrato: vegetal mixto-*Pleurotus* (azul), vegetal mixto-*Trametes* (rojo), pellet *Pleurotus* (gris) y pellet *Trametes* (naranja).

Los valores medios de crecimiento del radio mayor para cada una de las especies según los tipos de sustrato se muestran en la tabla 2.

FECHA REALIZACIÓN DE LA MEDICIÓN	FEBRERO						MARZO							
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
SUSTRATO A ESTUDIO														
Sustrato de monte de Cauce	<i>Pleurotus ostreatus</i>	13,27 ±1,82	18,54 ±2,76	23,80 ±5,18	29,07 ±7,80	34,37 ±14,17	41,81 ±20,83	43,52 ±21,3	47,07 ±24,8	51,97 ±22,9	56,87 ±22,6	61,76 ±23,9	66,66 ±26,4	66,79 ±26,4
Sustrato de monte de Cauce	<i>Trametes versicolor</i>	16,86 ±2,29	21,52 ±3,08	26,17 ±4,77	30,83 ±6,71	34,18 ±9,47	36,82 ±12,18	40,52 ±15,0	40,12 ±14,7	42,17 ±15,7	43,18 ±14,8	44,21 ±15,7	44,08 ±19,2	44,08 ±19,2
Pellet de paja	<i>Pleurotus ostreatus</i>	12,81 ±1,52	18,73 ±2,77	24,73 ±5,07	30,73 ±7,51	38,61 ±9,86	47,45 ±12,89	50,42 ±15,2	56,75 ±19,6	63,57 ±24,9	70,41 ±20,4	77,24 ±18,5	84,06 ±15,7	84,06 ±15,7
Pellet de paja	<i>Trametes versicolor</i>	13,77 ±1,93	22,83 ±2,92	31,97 ±5,07	41,07 ±6,87	47,81 ±5,42	58,53 ±7,46	65,31 ±25,9	72,07 ±13,7	74,62 ±8,41	77,25 ±8,37	82,51 ±8,66	82,51 ±8,66	82,51 ±8,66

Tabla 2: medias y desviación típica de los radios mayores para cada sustrato y especie.

Con el fin de verificar la normalidad de los resultados obtenidos realizamos un gráfico Q-Q normal para las dos especies (*Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*) y los dos tipos de sustrato.

Se han considerado sólo los datos más significativos, es decir, los correspondientes al 2º, 5º y 10º días, ya que como se indica anteriormente, en el 1º día el crecimiento fue inapreciable y después del 10º, varias placas habían alcanzado el desarrollo máximo. Por ello, se decidió eliminar los valores del 1º día, puesto que el crecimiento era mínimo, y también los del 10º día en adelante, ya que muchas de las placas habían alcanzado su crecimiento máximo y no aportaban información útil.

Con estos resultados se ha observado que la distribución se aproxima a una normal de igual media y desviación estándar (figura 3 izquierda). Posteriormente, para observar posibles valores atípicos se ha realizado un diagrama de cajas en el que se representan la mediana y los cuartiles. La caja representa la distribución del 50% de los resultados, en tanto, las barras indican la desviación del cuartil 1 a 3 del rango intercuartílico medio $x \pm 1.5 (Q_{(1,3)} \pm 1.5 \times IRC)$ entre el 95 y el 99% de la distribución (figuras 3 centro). Y, por último, se elabora un gráfico de densidad que nos permite apreciar fácilmente la simetría y la curtosis del conjunto de datos (figura 3 derecha).

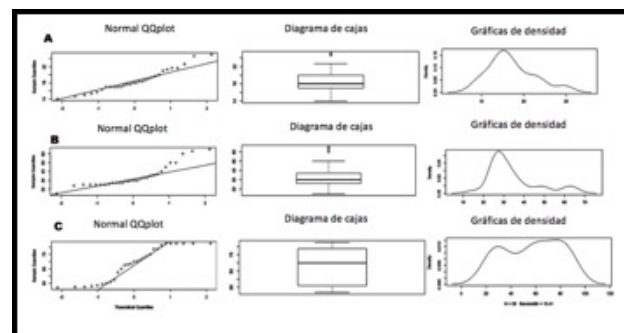


Figura 3: ejemplo de verificación de normalidad en sustrato mixto para *Pleurotus ostreatus*: días 2(A), 5(B) y 10 (C).

Posteriormente, para verificar la normalidad de los datos para cada día se realizó un Shapiro Test. Y como existe al menos un

tratamiento que presenta un valor significativo (p-valor inferior a 0,05, no es posible aceptar que se distribuyen de forma normal. Por ello, se ha realizado la prueba estadística Krustal-Wallis (Hollander & Wolfe, 1973), equivalente al análisis de varianza (ANOVA) aplicable para valores no paramétricos.

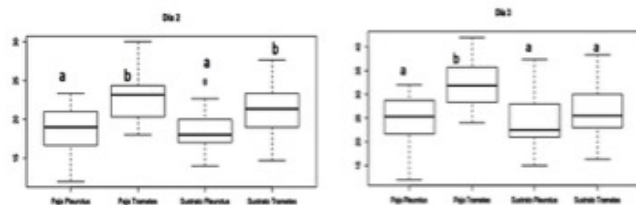


Figura 4: se muestran las igualdades entre tratamientos en cada uno de los días mediante gráficos boxplot.

Para desarrollar este test estadístico se consideran dos posibilidades: hipótesis nula (H_0), para la igualdad de distribución entre todos los tratamientos, e hipótesis alternativa (H_1), cuando existe diferencia en las distribuciones en al menos dos tratamientos. Los valores significativos (p-valor) para todos los días son inferiores a 0,05, lo que implica que es posible rechazar la hipótesis nula (H_0) con un nivel de confianza del 95 %. Esto supone la aceptación de la H_1 ; es decir, existen al menos dos tratamientos que son diferentes. A continuación, para conocer las diferencias existentes entre los tratamientos para cada uno de los días se realiza un análisis post-hoc por el método de Bonferroni (Dunn, 1964). Este análisis emplea la prueba U de Mann-Whitney (Hollander & Wolfe, 1973) para realizar comparaciones dos a dos entre los diferentes tratamientos. El resultado de este tratamiento estadístico se representó en diagramas de cajas (figura 4).

Discusión de los resultados

En la figura 1 se puede observar como la seta ostra (*Pleurotus ostreatus*) presenta un crecimiento ligeramente mayor en pellet de paja frente al sustrato vegetal mixto o forestal. Algo semejante, aunque con una diferencia más marcada, ocurre con la cola de pavo (*Trametes versicolor*).

En la seta ostra los radios mayores continúan creciendo hasta el último día de medición en ambos tratamientos; de hecho, la mayor cantidad de placas con desarrollo completo pertenecen a ésta sobre sustrato mixto, seguido de cerca por la misma especie en pellet de paja. En la cola de pavo el crecimiento es lineal hasta el 8º día, en el que se estanca en el sustrato vegetal mixto y aumenta ligeramente para el pellet (figura 1). Este estancamiento se puede deber a que parte de las placas presentan crecimiento parcial o nulo; sin embargo, en la seta ostra todas han crecido, total o parcialmente.

La tasa media de crecimiento en el sustrato vegetal, compuesto esencialmente por eucalipto y palmera (vegetal mixto) ha sido menor que en los pellets de paja, probablemente debido a factores inhibidores para el crecimiento de macromicetos por parte de ciertas monocotiledóneas de porte arbustivo y/o

arbóreo (Armoa & Campi (2016), y del eucalipto (Oudia *et al.*, 2008; González *et al.*, 2017).

Como se indica en el apartado de resultados, el problema de las contaminaciones en los pellets de paja se ha intentado evitar repitiendo el experimento con mayor tiempo de esterilizado y mayor temperatura; sin embargo, han persistido algunas contaminaciones.

Para averiguar si el responsable de la contaminación era el pellet comercial que podía portar algunas formas resistentes de *Penicillium*, se incubaron placas control (sin micelio), tanto con sustrato comercial sin tratamiento como previa congelación durante 72 horas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, antes de introducirlo en el autoclave. El número de contaminaciones no ha disminuido mediante el congelado, lo que hace suponer que las contaminaciones observadas se producen en el momento de la manipulación.

Debido a la complejidad del proceso experimental y las diferencias entre los tratamientos los datos de crecimiento no resultan fáciles de interpretar. Puede observarse que el 2º día el crecimiento presenta una diferenciación entre especies. Para ambos sustratos, *Trametes versicolor* presenta un mayor crecimiento que *Pleurotus ostreatus*.

Y, desde el 3º hasta el 5º días, el primero presenta en pellet de paja un crecimiento significativamente superior que el de los otros 3 grupos. La cola de pavo en la naturaleza tiene una fase de su vida parásita bastante agresiva (García Rollán 2007), lo que probablemente sea responsable de que en esta primera fase se manifieste un mayor crecimiento, mayor que en los restos de palmera y eucalipto, que pueden comportarse como inhibidores del crecimiento en ciertas especies (Armoa & Campi, 2016 y González *et al.*, 2017).

Esta trayectoria cambió a partir del 6º día hasta el 8º días. En este período tanto *Pleurotus ostreatus* como *Trametes versicolor* presentan un crecimiento similar en pellet de paja, y mantienen ciertas semejanzas con el otro sustrato en ambas.

A partir del 9º día, tanto una especie como la otra, presentan menor crecimiento en sustrato vegetal mixto que en pellet, manifiestamente menor en la seta ostra, probablemente debido a las inhibiciones ya comentadas de las palmeras (Armoa & Campi 2016; González *et al.*, 2017).

Conclusiones

Estos datos permiten concluir que los sustratos vegetales, tanto pellet como mixtos forestales, necesitan ser hidratados, previamente a la esterilización, para favorecer el desarrollo de posibles estructuras de resistencia, que serán eliminadas con tratamiento de esterilización durante 30 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, con repetición a las 24 h.

Además, la seta de ostra (*Pleurotus ostreatus*) y la cola de pavo (*Trametes versicolor*) presentan un crecimiento ligeramente mayor en pellet de paja comercial frente a sustrato vegetal mixto de origen forestal (eucalipto y palmeras). Sin embargo, no se detectan diferencias significativas entre el crecimiento final para ambas especies en los pellets de paja y tampoco entre los crecimientos de ambas especies para el sustrato vegetal mixto.

Bibliografía

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. New York: Wiley (4ª edición).
- Armoa, J., Campi, M. (2016) Evaluación del crecimiento de macrohongos de interés biotecnológico en residuos agroindustriales y madereros. *Steviana* 8(2): 7-15.
- Cañedo, V., Ames, T. 2004. *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Castillo, R.F. (2005). *Bioteología Ambiental*. Madrid: Tébra.
- Castro, M., Justo, A., Lorenzo, P., Soliño, A. (2005). *Guía micológica dos ecosistemas galegos*. A Coruña: Baía Edicións.
- Coello Paredes, J.M. (2011). *Aplicación del hongo Pleurotus ostreatus como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Guayaquil, disponible en <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21150/1/D-92862.pdf> [consultado el 15/02/2018]
- Dunn, O.J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6: 241-252.
- García Rollán, M. (2007). *Cultivo de setas y trufas*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- González, N., Elissetche, J., Pereira, M., Fernández, K. (2017) Extraction of polyphenols from Eucalyptus nitens and Eucalyptus globulus: Experimental kinetics, modeling and evaluation of their antioxidant and antifungal activities. *Industrial Crops & Products* 109: 737-745.
- Hollander, M. and Wolfe, D. A. (1973) *Nonparametric Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons.
- Lindequist, U., Won Kim, H., Tiralongo, E., van Griensven, L.J.L.D. (2014). Evidence-based complementary and alternative medicine. *Medical mushrooms* 2014: 1-2 disponible en <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/806180/> [consultado 19/01/2018].
- Oudia, A., Queiroz, J., Simões, R. (2008) Potential and limitation of Trametes versicolor laccase on biodegradation of Eucalyptus globulus and Pinus pinaster kraft pulp. *Enzima and Microbial Technology* 43: 144-148.
- Ozcariz Fermoselle, V. (2016). *Aprovechamiento de residuos agroforestales, con particular interés en los originados en explotaciones de nuez pecán (Carya illinoensis), por medio del cultivo de hongos saprófitos saludables ibéricos*. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/16680/1/Tesis942-160406.pdf> [consultada 12/01/2017].
- R Core Team (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> [consultada 23/04/2018].
- Ríos, M.P., Hoyos, J.L., Mosquera, S.A. (2010). Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de Pleurotus ostreatus propagada en diferentes medios de cultivo. *Nutrifaca* 8(2): 86-94
- Rodríguez-Vázquez, J.; Castro, M.L. (2016). *Micobiota galega, 1867-2015 (Ascomycota, Basidiomycota)*. Documento preliminar para a base de datos micológica galega MicobiotaGalicia.mdb. Edita Grupo Micológico Galego. Disponible en: <http://www.mykes.es/contidos/20/> [consultada 30/01/2018].
- Royston, P. (1982) An extension of Shapiro and Wilk's W-test for normality to large samples. *Applied Statistics*, 31, 115-124.
- Sierra Fernández, J.L., López Díaz, T.M., Eiroa García-Garabal, J.A. 2002. *Lo que usted debe saber de setas cultivadas*. León: Soc. Micol. Leonesa «San Jorge» & Caja España.
- Straus, L.G., González Morales, M.R., Carretero, J.M., Marín-Arroyo, A.B. (2015). The Red Lady of el Mirón. Lower Magdalenian life and death in Oldest Dryas Cantabrian Spain: an overview. *J. Arch. Sci.* 60: 134-137.
- Suárez, C., Holguín, M. (2011). Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semillas de setas comestibles. *Revista Colombiana de Ciencias Históricas*. 5: 130-140.
- Varnero, M.T., Quiroz, M.S., Álvarez, C.H. (2010) Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Información Tecnológica* 21(2): 13-20